Ueber die Bedeutung der Mikroorganismen für die im Erdboden stattfindende Nitrification.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE

DER

HOHEN MEDICINISCHEN FAKULTÄT

DER

KGL. FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT

ZU

ERLANGEN

VORGELEGT

VON

EMIL BEHREND

AUS NEU-STETTIN.

BERLIN.

1889

Gedruckt mit Genehmigung der medicinischen Facultät.

Referent: Herr Prof. Dr. **J. Rosenthal.**

Seiner lieben Mutter

und

dem Andenken seines theuren Vaters

gewidmet.

Der Verfasser.

Bei der Wichtigkeit, welche die Frage von der Nitrification stickstoffhaltiger Substanzen im Erdboden hat, ist es leicht erklärlich, dass eine sehr grosse Anzahl von Untersuchungen über diesen Gegenstand vorliegt. Ist ja die Frage nach dem Schicksale der im Boden vorhandenen oder demselben zugeführten organischen Substanzen eine der wichtigsten in der Hygiene des Bodens und besonders ist in wirthschaftlicher Beziehung die Ursache der Salpeterbildung in der Ackererde so interessant, weil die Pflanzen vorwiegend auf salpetersaure Verbindungen zur Deckung ihres Stickstoffbedarfs angewiesen sind, diese aber in den meisten Düngemitteln nicht von vornherein existieren, sondern erst durch gewisse Vorgänge erzeugt werden.

Trotzdem hat diese Frage noch keine endgiltige Entscheidung gefunden und es stehen sich über viele Punkte derselben ganz widersprechende Ergebnisse und Meinungen gegenüber.

Die Chemiker waren es zuerst, welche den Vorgang der Salpeterbildung, der doch im Erdboden in so ausgedehnter Weise (Chilisalpeter etc.) fortwährend stattfindet, zu wiederholen versuchten, und aus ihren Versuchen hat sich ergeben, dass man sehr wohl im Stande ist, durch verschiedene chemische Processe die Nitrification des Ammoniaks auf rein chemischem Wege zu bewirken. So hat schon

Dumas[1]) im Jahre 1846 gefunden, „dass, wenn bei 100° ein mit Ammoniak vermischter feuchter Luftstrom über Kreide geleitet wird, die mit Kalilösung befeuchtet ist, nach einigen Tagen eine grosse Menge Kaliumnitrat entsteht.“

Dann hat Carius in einer Abhandlung: „Bildung von salpetriger Säure, Salpetersäure und Wasserstoffsuperoxyd in der Natur“[2]) durch genaue Untersuchungen bewiesen, dass beim Durchleiten von ozonhaltigem Sauerstoff durch wässeriges Ammoniak Nitrification stattfindet, und er ist der Meinung, dass gerade dieser Process der wichtigste für die Bildung salpetrig- und salpetersaurer Salze in der Natur sei.

Dass auch Metalle Nitrification bedingen, hat Schönbein[3]) für Platin, Kupfer und Nickel, Millon[4]) für Eisen nachgewiesen, und zwar geschieht dies nicht nur bei hoher, sondern auch bei gewöhnlicher Temperatur. Auch einige Metalloxyde, wie Eisenoxyd und Kupferoxydul sollen nach Liebig[5]) Oxydation des Ammoniakgases bewirken, jedoch konnte dies von Millon[6]) nur für die in der Glühhitze stattfindende Wechselwirkung der genannten Körper bestätigt werden.

Ausserdem ist die Nitrification des Ammoniaks beim Durchschlagen elektrischer Funken durch wässrige Ammoniakflüssigkeit (Schönbein[7]) sowie beim Durchleiten von Luft und Ammoniakgas durch eine glühende Röhre (Fourcroi, Kuhlmann[8]) nachgewiesen worden.

Auf diese Ergebnisse stützte man sich nun bei der Beurtheilung des Ursprungs des Salpeters im Erdboden und

[1]) Comptes rendus T. XX., 1020.
[2]) Liebig, Ann. 174, 31.
[3]) Journ. f. pr. Chemie (1) 70, 129 u. 84, 213.
[4]) Compt. rend. 51, 548.
[5]) Mag. Pharm. 33,40.
[6]) Compt. rend. 51, 548.
[7]) Gmelin-Kraut, Handb. d. Chem., 1. Abth., 2, 472.
[8]) Dingler, Pol. J. 73, 60.

glaubte, die Nitratbildung als einen rein anorganischen Process auffassen zu können.

Da erschienen im Jahre 1877 zwei Arbeiten von Schlösing und Müntz: „Sur la nitrification par les ferments organisés“ [1]), die mit einem Schlage diese Frage in ein ganz neues Stadium überführten. Die Versuche, welche die genannten Forscher anstellten, waren folgende: Sie leiteten ammoniakhaltige Spüljauche durch ein mit geglühtem Quarzsand und Calciumcarbonat gefülltes, weites Glasrohr von einem Meter Länge in sehr langsamem Strome. In der abtropfenden Flüssigkeit zeigte sich kein Ammoniak mehr, wohl aber eine beträchtliche Menge Salpetersäure. Als dann geringe Mengen von Chloroformdampf durch den Apparat geblasen wurden, fand keine Nitrification mehr statt; dann wurde sämmtliches Chloroform wieder aus der Röhre entfernt, und nachdem eine kleine Menge nitrificirender Erde, die in Wasser aufgeschlämmt war, in den Apparat gebracht und dem Sauerstoff genügender Zutritt gestattet wurde, begann sofort bei geeigneter Temperatur die Salpeterbildung von Neuem.

Dieses Verhalten erklärten nun Schlösing und Müntz einfach dadurch, dass es organisirte Fermente seien, welche man als die eigentlichen Urheber der Nitrification anzusehen habe, die durch das Chloroform getödtet würden, und dass durch Aussäen von neuen Keimen einer nitrificirenden Erde der Process zu jeder Zeit wieder eingeleitet werden könnte. Diese Ansicht wurde noch dadurch sehr gestützt, dass eine bei 100° sterilisirte Erde die Fähigkeit der Nitrification verlor.

Diese Versuche wurden dann durch die in dem landwirthschaftlichen Laboratorium zu Rothamsted von Warrington [2]) angestellten Experimente mit der Einschränkung bestätigt, dass die Nitrification nur im Dunkeln vor sich gehe;

---

[1]) Compt. rend. 84, 301 u. l. c. 85, 1018.

[2]) Chem. News 36, 263 u. Chem. Soc. J. 33, 44.

doch haben neue Untersuchungen von Schlösing und Müntz gezeigt, dass auch bei schwachem Licht die Nitrification ebenso stark als im Dunkeln stattfindet: bei grellem Licht würde sie allerdings etwas gehemmt, jedoch nicht vollständig aufgehoben; auch eine gewisse Menge von Sauerstoff sei zur Nitrification nothwendig, ebenso ein gewisser Grad von Feuchtigkeit, jedes Eintrocknen hebe die Wirkung des Fermentes auf. Ferner bemerken sie, dass die Nitrification nur zwischen gewissen Temperaturgrenzen vor sich gehe. Unter 5° sei sie sehr schwach, bei 12° würde sie stärker, von da steige die Energie derselben mit der Temperatur und erreiche bei 37° ihr Maximum, dann folge schnelle Abschwächung und bei 55° entstehe keine Spur von Salpeter mehr. Gegenwart von Carbonaten alkalischer Erden begünstige den Vorgang, während geringe Mengen neutraler Salze keinen Einfluss ausüben. — Reichliche Bildung von Nitriten haben die erwähnten Forscher öfter in Flüssigkeiten als in Bodenarten gesehen und zwar, wenn die Temperatur unter 20 Grad oder wenn der Luftzutritt ein beschränkter war.

Ebenso, wie es wahrscheinlich gemacht ist, dass die Salpeterbildung im Boden als ein physiologisch-chemischer Vorgang an die Entwickelung von Organismen geknüpft ist, so ist wohl auch der umgekehrte Vorgang, die Reduction der Nitrate als ein physiologischer Process aufzufassen, der überall eintritt, wo Mangel an Sauerstoff herrscht.

Schon durch die älteren Versuche von Schlösing und Müntz ergab sich, dass die Salpetersäure aus dem Boden verschwand, sobald der Luftzutritt verhindert wurde; namentlich aber haben die im Jahre 1883 von Dehérain und Maquenne[1]) angestellten Versuche gezeigt, dass bei dem Vorhandensein grösserer Mengen von organischen Stoffen und Nitraten im Erdboden die Reduction der letzteren bei

[1]) Compt. rend. 1882, XCV, 691 und Annales agronomiques 1883, IX, Fac. I.

Luftabschluss sofort eintritt und Kohlensäure und Stickstoff in beträchtlichen Quantitäten entwickelt werden.

Die gleichen Resultate in Bezug auf die Denitrification erhielt Munro [1]), die er in einer längeren Arbeit „Die Bildung und Zerstörung von Nitriten und Nitraten in künstlichen Lösungen und im Fluss- und Quellwasser" bespricht und bei welcher er zu der Schlussfolgerung kommt, dass es Fermente geben muss, welche die Fähigkeit haben, vorhandene Nitrate und Nitrite bei Gegenwart von organischer Substanz zu desoxydiren.

Aus den oben beschriebenen Versuchen geht zwar mit grosser Wahrscheinlichkeit hervor, dass es Mikroorganismen sind, welche die Nitrification der Ammoniaksalze des Erdbodens bewirken; der sichere Beweis jedoch kann erst durch die Isolirung und Züchtung der nitrificirenden Bakterien sowie durch ihre Fähigkeit, zu jeder Zeit Ammoniaksalze in Nitrate zu verwandeln, erbracht werden.

Auch hier waren es zuerst Schlösing und Müntz [2]), welche in diesem Sinne Versuche anstellten. Nachdem sie lange Zeit keinen positiven Erfolg erzielen konnten, gelang es ihnen schliesslich, aus schwach alkalischem Erdboden einen Organismus zu isoliren, der die Salpeterbildung veranlasste. Dieser Organismus besteht nach ihnen aus länglichen Stäbchen von sehr geringer Grösse, welche eine grosse Aehnlichkeit mit den von Pasteur und früher schon von Koch in den Wässern gefundenen glänzenden Körperchen (corpuscules brillants) hatten. Derselbe ist weit verbreitet in der Ackererde und allen organische Substanzen enthaltenden Wässern; nur in der Luft scheint er nicht vorzukommen.

Dann folgten Untersuchungen von A. Celli und F. Marino-Zuco (1886), die unter Anwendung aller Cautelen in wässrigen Culturen, auf Sand und Platinschwamm aus-

[1]) Chem. Soc. 1886, 632—681.

[2]) Compt. rend. 86, 892 (1877) und 89, 891 (1878).

geführt wurden und die sich auf viele Arten von Mikroorganismen erstreckten; jedoch konnten sie die Behauptung von Schlösing und Müntz, dass die Bakterien die unentbehrliche Bedingung für die Nitrification ausmachen, nicht bestätigen, sondern fanden nur, dass dieselben diesen Process in beträchtlichem Grade erleichtern. Auch sie haben Keime gefunden, zu denen sie den Bacillus der asiatischen und der Cholera nostras rechnen, die im Stande sind, Nitrate zu desoxydiren.

Auch Heräus[1]), der eine Abhandlung: „Ueber das Verhalten der Bakterien im Brunnenwasser" im Jahre 1886 veröffentlichte, gelang es nicht, mit den aus Brunnenwasser gezüchteten Bakterien Ammoniaksalze zu nitrificiren. Ebenso bekämpft er die Behauptung von Schlösing und Müntz, dass das Salpeterferment nicht in der Luft vorkäme, indem er zeigte, dass in einem Harn, der etwas Ammoniak enthielt, nach längerem Stehen an der Luft aus dem Ammoniak Nitrate gebildet wurden. Wurde dann das Gefäss, in dem sich der Harn befand, luftdicht verschlossen, so verschwand das Nitrat; es wurde jedoch von Neuem, wenn auch langsam, gebildet, sobald der Harn wieder der Luft ausgesetzt wurde.

Von dem Botaniker Frank[2]) in Berlin wird die Behauptung von Schlösing und Müntz, dass die Nitrification unter dem Einfluss von Mikroorganismen stattfinde, auf das eifrigste bekämpft. Derselbe hat auf Grund jener Beobachtung versucht, die Pilze zu züchten und mit denselben Salpetersäurebildung zu bewirken. Er nahm dazu einen Spaltpilz aus einer Bodenart, die stark nitrificirende Eigenschaften zeigte, züchtete die Sporen bis zur vollen Entwickelung und setzte sie in Lösungen von Chlorammonium, welches vorher unfruchtbar gemacht war. Die ganze Versuchsreihe zeigte jedoch negative Resultate; es fand keine Nitrification statt. Nun mischte Frank den gezüchteten Pilz mit sterilisirter

[1]) Zeitschrift f. Hygiene 1886, B. I.

[2]) Bericht d. deutsch. bot. Ges. 1886, IV, 108.

Ackererde und erreichte damit Nitrification; indess fand letztere unter den gleichen Bedingungen auch ohne Pilz statt.

In Folge dieser Versuche kommt er zu dem Schluss, dass allerdings in den verschiedensten Bodenarten Mikroorganismen nachgewiesen seien, dass dieselben aber Ammoniaksalze in Salpetersäure nicht überzuführen vermögen. Im Gegensatz dazu übten Bodenarten, in welchen die Bakterien nicht vorkommen und die vorher sterilisirt wurden, eine nitrificirende Wirkung aus.

Diese Frank'schen Versuche wurden in dem chemischen Laboratorium der landwirthschaftlichen Hochschule zu Berlin von Plath[1]) unter allen Cautelen in eingehendster Weise wiederholt und ergaben genau das Gegentheil von dem, was Frank gefunden hatte.

Plath kommt nämlich aus seinen Versuchen zu dem Endresultat, dass bei Ausschluss aller Organismen weder die einzelnen Bestandtheile des Bodens, noch die Erde selbst das Vermögen besitzen, die Oxydation des Ammoniaks zu salpetriger Säure oder Salpetersäure zu veranlassen. Dies führe somit wieder zu der Annahme, dass es Mikroorganismen sein müssen, welchen das Vermögen der Nitrification zukomme.

In einer Erwiderung auf die Plath'sche Arbeit wird von Frank[2]) ziffermässig dargelegt, wie stark gewisse Bodenarten auch im sterilisirten Zustande Ammoniaksalze zu nitrificiren vermögen. Frank findet auch in diesen seinen neuen Versuchen eine Bestätigung seiner früheren Ergebnisse, dass die Nitrification der Ammoniaksalze im Erdboden ohne Betheiligung von Mikroorganismen erfolgt, dass vielmehr bei diesem Vorgange der Erdboden als poröser Körper ähnlich wie Platinschwamm wirkt.

---

[1]) „Ueber die Nitrification des Ammoniaks und seiner Salze". Landwirthsch. Jahrb. B. XIV. Heft 6.

[2]) Deutsche landwirthsch. Presse XIV. Jahrg., No. 104.

[3]) Landwirthsch. Jahrb. B. XVII.

In Folge dieser Erwiderung unterzog dann Plath[3]) seine Versuche einer nochmaligen gründlichen Wiederholung; dieselben führten jedoch genau wieder zu denselben Ergebnissen, welche er bei seiner ersten Untersuchung erhalten hatte.

Obwohl aus dem Gesagten hervorgeht, dass durch die Untersuchungen, welche bis jetzt über die Frage der Nitrification angestellt worden sind, noch keineswegs eruirt ist, wie dieselbe zu Stande kommt, so haben doch jene Untersuchungen das unbestreitbare Verdienst, die Wege gewiesen zu haben, auf denen diese Dinge in Angriff genommen werden können.

Ich habe nun zu dieser ebenso wichtigen als interessanten Frage einen kleinen Beitrag zu liefern gesucht, indem ich einen ähnlichen Weg einschlug, als die vorher genannten Forscher, in den Versuchsanordnungen aber mich von ihnen wesentlich entfernte.

Ich füllte nämlich in eine etwa $1^1/_2$ Liter fassende, am Boden mit seitlichem Tubus versehene Glasflasche (die, wie sich schon des öfteren bei den Versuchen Anderer und auch bei den meinigen wieder herausstellte, sich viel besser zu diesen Untersuchungen eignen als Blechflaschen) entweder ein Gemisch von Gartenerde und Sand oder Holzkohle, welche ich mit Lösungen stickstoffhaltiger Substanzen beschickte und zwar in der Weise, dass ich das eine Mal die Mikroorganismen tödtete, ein anderes Mal aber sie ungestört einwirken liess. Nachdem die Flasche mit diesen Substraten beschickt war, wurde sie gut verkorkt und verlackt, so dass die äussere Luft nicht hineingelangen konnte. Der Stopfen in dem Hals der Flasche wurde zweimal durchbohrt und in die Bohrungen Glasröhren luftdicht eingefügt, von denen die eine zur Verbindung der Flasche mit den Vorlagen, die andere zur Einfüllung der gelösten stickstoffhaltigen Substanzen diente. Der untere seitliche Tubus der Flasche war ebenfalls fest verkorkt und in den durchbohrten Stopfen eine Glasröhre eingefügt, durch welche die Flasche vermittelst eines Schlauches an die mit derselben zu verbindenden Ab-

sorptions-Apparate angeschlossen werden konnte. Die Erde resp. Kohle, welche ich zu diesen Versuchen gebrauchte, wurde, um sie von allen daran haftenden störenden Bestandtheilen zu befreien, mit heissem Wasser ausgewaschen, ausgeglüht und dann bei den Versuchen mit sterilisirten Substraten in die Glasflasche gefüllt, um gleich darauf in einem Heizkasten einer Temperatur von 160° C. ausgesetzt zu werden. Die Glasröhren wurden mit kleinen Stückchen loser, steriler Watte ausgefüllt, um das Eindringen von Mikroorganismen gänzlich zu verhindern. Bei den Versuchen mit nicht sterilisirten Substraten blieb die Erde resp. Kohle auf drei Bogen Fliesspapier mehrere Tage lang ausgebreitet liegen, um den Mikroorganismen genügende Gelegenheit zu geben, sich auf derselben anzusiedeln. Nachdem die Glasflasche, wie oben beschrieben, gefüllt war, wurden in dieselbe die Lösungen von verschiedenen stickstoffhaltigen Substanzen, wie Ammoniumcarbonat, Salmiak, Harnstoff, frischer Harn, Leucin, Pepton, Eiweiss unter den strengsten antibakteritischen Cautelen eingesogen, indem alle zu diesem Acte nothwendigen Gefässe, Schläuche, Röhren und Watte die ganze Zeit hindurch mit strömendem Wasserdampf behandelt wurden. Nachdem diese Vorbereitungen getroffen waren, wurde die Flasche in die Apparatenkette eingefügt, die ich folgendermaassen zusammenstellte:

Um die Luft, welche durch die mit Erde oder Holzkohle gefüllte Flasche hindurchströmen sollte, von Kohlensäure zu befreien, liess ich sie durch eine mit Kalilauge gefüllte Flasche und durch einen mit Kali-getränkten Bimsteinstückchen gefüllten Thurm hindurchgehen. In einer an den Thurm angeschlossenen, Schwefelsäure enthaltenden Flasche wurde das Ammoniak, das sich ja immer, wenn auch nur in Spuren, in der Luft befindet, zurückgehalten. Auf der andern Seite musste die Erde mit Vorlagen in Verbindung gebracht werden, in denen diejenigen Stoffe absorbirt werden konnten, die bei der Zersetzung der stickstoffhaltigen Substanzen muthmaasslich aus dem Stickstoff entstehen würden. Da ist nun als erstes und

bekanntestes Zersetzungsprodukt das Ammoniak zu nennen, das auch als Carbonat, wie z. B. bei der Harngährung, entstehen kann, ferner die Salpetrigsäure in Form des NH_4-Salzes und daraus bei weiterer Oxydation Salpetersäure in Form desselben Salzes. Gelegentlich untersuchte ich dann noch auf Kohlensäure und bei den Substanzen, die Schwefel enthalten, auf Schwefelwasserstoff. Deshalb setzte ich die die Erde bezw. Kohle enthaltende Flasche in Verbindung mit einer Normalnatronlaugevorlage (50 ccm), um die entstehende Kohlensäure, Salpetrigsäure, Salpetersäure und Schwefelwasserstoff zu absorbiren und zweitens mit einem kleinen Kolben, der mit 50 ccm Normalschwefelsäure gefüllt war, um das sich bildende Ammoniak aufzufangen. Dann folgte eine Sicherheitsflasche zum Auffangen des etwa aus der Saugpumpe zurücksteigenden Wassers und endlich ein Ventil, welches dazu diente, bei ungleichmässigem Wirken des Wasserleitungsdruckes, was hier in Erlangen leider recht oft vorkommt, die Stärke des Luftstromes immer auf annährend gleicher Höhe zu halten. So stellte ich zuerst jede Apparatenkette einzeln auf, vereinfachte mir die späteren Versuche aber dadurch, dass ich 6 resp. 7 solcher Ketten von Apparaten nebeneinander brachte; wobei sich zeigte, dass eine Sicherheitsflasche, ein Ventil und eine Saugpumpe vollkommen für alle 7 Ketten genügte. Durch geeignete Anlegung von Quetschhähnen im Verein mit der ausgeprobten Stellung des Ventils erreichte ich dann, dass in sämmtlichen kleinen Kolbenvorlagen nur kleine Blasen in langsamer Aufeinanderfolge hindurchgingen.

Nachdem die einzelnen Theile in dieser Weise vorbereitet waren, wurden die Apparate in Gang gesetzt, d. h. die Luft wurde in langsamem, aber constantem Strome mit geringer Kraft durch die ganzen Apparatenketten hindurchgesogen.

Bevor ich nun zu der Mittheilung der Ergebnisse meiner Versuche übergehe, seien hier die Methoden auseinandergesetzt, nach denen ich das Ammoniak, die Salpetrigsäure,

Salpetersäure, Schwefelwasserstoff und Kohlensäure qualitativ und die ersten drei Substanzen quantitativ bestimmt habe. Denn da ich bei allen Versuchen die gleichen Methoden anwandte, so würde es viel zu weitläufig sein, dieselben bei den einzelnen Versuchen wiederholt zu beschreiben; ich werde mich vielmehr dort immer auf das hier Gesagte beziehen können.

Die Absorption des Ammoniaks wurde, wie bereits gesagt, durch eine Vorlage mit Schwefelsäure bewirkt, und der Nachweis desselben geschah bei jedem Versuche qualitativ sowohl durch Nessler'sches Reagens als auch in den Dämpfen der mit Natronlauge versetzten Flüssigkeit. Zur quantitativen Bestimmung des Ammoniaks bediente ich mich der Schlösing'schen Methode, welche darin besteht, dass die auf Ammoniak zu prüfende Flüssigkeit in einem abgeschlossenen Raume mit Kalkmilch versetzt wird und die entstehenden Dämpfe des dadurch frei gewordenen Ammoniaks in einem darüber befindlichen Schälchen mit Schwefelsäure von bekanntem Titer absorbirt werden. Die Differenz zwischen dem Anfangs- und Endtiter ergiebt die Menge des absorbirten Ammoniaks.

Die Salpetrigsäure, die in der Natronlaugevorlage absorbirt wurde, bestimmte ich qualitativ durch Hinzufügen von verdünnter Schwefelsäure und Jodzinkstärkelösung (Bläuung) sowie durch schwefelsaure Metaphenylendiaminlösung (Bräunung) und quantitativ nach der Methode von Tiemann und Preusse, welche auf der Bildung des Triamidoazobenzol (Bismarckbraun) beruht, die in schwefelsaurer Lösung bei der Wechselwirkung zwischen Salpetrigsäure und Metaphenylendiamin erfolgt. Die Ausführung der Methode geschieht in folgender Weise:

Eine bestimmte Menge der auf Salpetrigsäure zu prüfenden Flüssigkeit wird in einen farblosen Glascylinder gebracht und zu einer bestimmten Höhe mit destillirtem, salpetrigsäurefreiem Wasser aufgefüllt; dann wird eine kleine Menge (1 ccm) verdünnte (1 : 3) Schwefelsäure und 1 ccm Meta-

phenylendiaminlösung hinzugefügt. Gleichzeitig mit der Herstellung dieses Versuches versetzt man in einem andern Cylinder reines destillirtes Wasser mit einer bestimmten Menge einer Nitritlösung, von welcher jeder Cubikcentimeter 0,01 mgr Salpetrigsäure ($N_2 O_3$) enthält, füllt bis zur gleichen Höhe wie in dem ersten Cylinder auf, bringt auch hier dieselben Mengen verdünnter Schwefelsäure und Metaphenylendiamin hinzu und vergleicht den entstehenden Farbenton nach Verlauf von einigen Minuten mit der Färbung, welche die zu untersuchende Flüssigkeit angenommen hat. Durch einige Male wiederholte Versuche, bei denen man wechselnde Mengen der titrirten Nitritlösung anwendet, gelingt es bald, gleiche Farbentöne in den beiden Cylindern hervorzubringen. Aus der Menge der verbrauchten Nitritlösung lässt sich dann leicht die Menge der Salpetrigsäure in der untersuchten Flüssigkeitsprobe bestimmen.

In derselben Natronlaugevorlage wurde die Salpetersäure bestimmt, und zwar bediente ich mich zur qualitativen Untersuchung der überaus empfindlichen Diphenylaminprobe. Die Intensität der Blaufärbung, welche bei Zusatz einiger Tropfen der zu prüfenden Flüssigkeit zu einem Gemisch von dem Amin und concentrirter Schwefelsäure auftritt, gestattet eine ungefähre Schätzung der vorhandenen Salpetersäure-Menge.

Die quantitative Bestimmung der Salpetersäure führte ich nach der volumetrischen Methode von Marx-Trommsdorff aus. Dieselbe beruht auf der oxydirenden und entfärbenden Einwirkung, welche die mit concentrirter Schwefelsäure versetzte Salpetersäure auf Indigolösung ausübt. Man führt die Prüfung in folgender Weise aus:

Eine bestimmte Menge der auf Salpetersäure zu prüfenden Flüssigkeit wird schnell mit einer ebenfalls bestimmten Menge einer concentrirten Schwefelsäure versetzt; darauf lässt man unter Umschütteln und ohne Verzug von einer verdünnten Indigolösung soviel hinzufliessen, dass die Flüssigkeit dadurch grünlich-blau gefärbt erscheint. Der Wirkungs-

werth der Indigolösung ist mit Hülfe einer Salpeterlösung von bestimmtem Gehalt vorher festgestellt worden. Aus der verbrauchten Anzahl Cubikcentimeter Indigolösung, welche erforderlich ist, um der weissen Flüssigkeit eine grünlichblaue Färbung zu ertheilen, kann man den Gehalt der zu prüfenden Flüssigkeit an Salpetersäure leicht ermitteln.

Die gelegentliche Prüfung auf Schwefelwasserstoff wurde in bekannter Weise durch alkalische Bleilösung ausgeführt.

Nachdem ich so die beiden Vorlagen qualitativ und quantitativ auf Ammoniak, Salpetrigsäure, Salpetersäure und Schwefelwasserstoff untersucht hatte, ging ich an die Prüfung des Inhalts der Flasche bezw. des Extractes, welches ich mir in der Weise aus der Erde resp. Kohle hergestellt hatte, dass ich die letzteren mit heissem Wasser übergoss, gründlich durchschüttelte und sodann das Wasser durch ein grosses, über ein Sieb gespanntes Filter ablaufen liess. Ich prüfte nun zuerst die Reaction der Extracte, untersuchte sie ebenfalls auf Ammoniak, Salpetrigsäure, Salpetersäure und Schwefelwasserstoff in der beschriebenen Weise und dampfte schliesslich den Rest ein, um bei den Versuchen, bei denen nur eine theilweise oder gar keine Zersetzung eingetreten war, die angewandten stickstoffhaltigen Substanzen wieder nachweisen zu können.

Auf die bei der Zersetzung der angewandten Substanzen sich bildende Kohlensäure prüfte ich nur qualitativ, da die Bestimmung derselben schon Gegenstand einer besonderen, im verflossenen Jahre von Kraus [1]) im hiesigen physiologischen Institut ausgeführten Arbeit war. Derselbe wies nach, „dass organische Verbindungen, welche in feinster Vertheilung auf irgend einem Substrat der Oxydation des Luftsauerstoffs unterworfen werden, bei uneingeschränkter gleichzeitiger Mitwirkung der Mikroorganismen in verhältnissmässig kurzer Zeit oxydirt werden, dass ferner nach theil-

[1]) Beiträge zur Kenntniss der Oxydationsvorgänge im Erdboden. Erlangen 1888.

weiser Abtötung der Mikroorganismen dieser Oxydationsprocess sich beträchtlich verlangsamt und dass endlich bei vollständigem Abschluss von Mikroorganismen in kürzerer Zeit eine Oxydation überhaupt nicht stattfindet".

Diese Versuche wurden in jüngster Zeit im hiesigen physiologischen Institut von Hirsch [1]) wiederholt; derselbe konnte in seiner Arbeit, die in allernächster Zeit veröffentlicht werden wird, die Resultate von Kraus vollkommen bestätigen.

I. Versuch.

Zu diesem Versuche verwendete ich gewöhnliche Gartenerde, die, tüchtig ausgewaschen und ausgeglüht, auf Fliesspapier 3 Tage lang ausgebreitet liegen blieb, um den Mikroorganismen Gelegenheit zu geben, sich darauf anzusiedeln, und dann in eine Blechflasche gefüllt wurde. Dieser Erde wurden nun 3 gr Ammoniumcarconat, in 100 ccm Wasser gelöst, zugesetzt, worauf die Flasche in den oben beschriebenen Apparat unsterilisirt eingefügt wurde. Die von Kohlensäure und Ammoniak befreite Luft wurde drei Wochen lang durch die Flasche geleitet und nach Verlauf dieser Zeit folgendes Resultat gefunden:

In der Natronlaugevorlage konnten nur Spuren von Salpetrigsäure, keine Salpetersäure, dagegen reichlich Kohlensäure nachgewiesen werden. In der Schwefelsäurevorlage zeigte sich reichlich Ammoniak. Das Extract des Substrates, das schwach alkalisch reagirte, enthielt keine Salpetrigsäure, dagegen reichliche Mengen von Ammoniak, Salpetersäure und Kohlensäure. Es hatte also unzweifelhaft eine Nitrification stattgefunden.

II. Versuch.

Bei diesem Versuch wurde wieder gut ausgewaschene und ausgeglühte Gartenerde als Substrat benutzt, diesmal aber

[1]) Ueber den Einfluss der Mikroorganismen auf die Zersetzung organischer Substanzen im Erdboden.

nach dem Ausglühen sofort in eine Glasflasche gefüllt und diese in einem Heizkasten einer Temperatur von 160° C. ausgesetzt. Alsdann wurde eine durch Kochen sterilisirte Salmiaklösung (3 gr in 100 ccm Wasser) unter den grössten antibakteritischen Cautelen auf die Erde aufgesaugt und die Flasche in den Apparat eingefügt. Die Luft wurde in gleicher Weise, wie in dem vorigen Versuche, durch den Apparat geleitet und wieder nach Verlauf von drei Wochen das Ergebniss festgestellt: Die Natronlauge enthielt keine Salpetrigsäure und Salpetersäure, sondern nur Spuren von Kohlensäure und zwar nicht mehr, als die bei meinem Versuche angewandte Natronlauge überhaupt enthielt; in der Schwefelsäurevorlage fanden sich ziemlich grosse Ammoniak-Mengen. Das Extract reagirte neutral, enthielt reichlich Ammoniak, dagegen keine Salpetersäure und Salpetrigsäure. Hier hatte also keine Nitrification stattgefunden.

III. Versuch.

Diesmal verwendete ich zerkleinerte, mit siedendem Wasser ausgewaschene und ausgeglühte Holzkohle und beschickte sie in derselben Weise, wie bei dem vorigen Versuche, mit drei Gramm Harnstoff, die in 100 ccm Wasser aufgelöst waren. Auch dieser Versuch war drei Wochen im Gange. Es zeigte sich bei der Untersuchung in der Natronlaugevorlage nur eine so schwache Gelbfärbung mit Metaphenylendiamin, dass man daraus die Anwesenheit einer quantitativ messbaren Menge Salpetrigsäure nicht schliessen konnte. Ebenso konnte keine Salpetersäure und nur Spuren von Kohlensäure nachgewiesen werden. Die Schwefelsäure-Vorlage zeigte kein Ammoniak. Die Reaction des Extractes war neutral; dasselbe gab reichlich Ammoniak, dagegen weder Salpetrigsäure, noch Salpetersäure. Auch hier ist also keine Nitrification eingetreten.

Aus diesen drei Versuchen ergab sich zwar, dass die sterilisirten Substrate keine Nitrification zeigten, während

sich in dem nicht sterilisirten Salpetersäure gebildet hatte; die Menge dieser letzteren war aber so gering, dass ich dieselbe nicht quantitativ bestimmen konnte. Ich liess deshalb in der Erwägung, dass vielleicht die Zeit zu kurz gewesen sein möchte, um eine vollständige Nitrification zu bewirken, die folgenden Versuche (von denen ich sieben zu gleicher Zeit anstellte), um ganz sicher zu gehen, vom 7. März bis zum 5. Mai, also acht Wochen im Gange.

IV. Versuch.

Zu diesem Versuche wurde ein Gemisch von Gartenerde und Sand verwendet, wieder in der gleichen Weise wie gewöhnlich sterilisirt und dasselbe mit 3 gr Harnstoff, in 100 ccm Wasser gelöst, beschickt. Die Dauer des Versuches betrug acht Wochen.

Als Resultat fand ich in der Natronlaugevorlage wieder ganz geringe Mengen von Salpetrigsäure. Die Prüfung mit Diphenylamin ergab eine hellblaue Färbung, die allerdings so schwach war, dass man annehmen muss, sie sei durch irgend welche Verunreinigung oder durch Eindringen von salpetersauren Dämpfen aus der Laboratoriumsluft beim Oeffnen des Kolbens zu Stande gekommen, zumal bekannt ist, dass diese Reaction so empfindlich ist, dass selbst Flüssigkeiten, von denen man annimmt, sie seien rein und in welcher sich auch mit anderen Proben Salpetersäure nicht nachweisen lässt, diese Reaction geben. In der Schwefelsäurevorlage war die Ammoniakmenge nicht erheblich. Das Extract, das schwach alkalisch reagirte und dessen Menge 106 ccm betrug, zeigte mit Nessler's Reagens starke Ammoniakreaction. Die Tritration ergab, dass auf 10 ccm der zur Ammoniakabsorption nach Schlösing verwendeten Schwefelsäure gebraucht wurden 9,47 ccm Normalnatronlauge; eine zweite und dritte Titration mit dem Rest der Schwefelsäure ergab nahezu das gleiche Resultat. Da ich nun 106 ccm Extract

erhalten hatte, so wurden im Ganzen $(10 - 9{,}47) \times 10{,}6$ Schwefelsäure durch Ammoniak neutralisirt, d. h.

$$(10-9{,}47) \times \frac{10{,}6 \times 17}{1000} = 0{,}1 \text{ gr Ammoniak.}$$

Ferner ergab die colorimetrische Untersuchung nach Tiemann und Preusse, mit Metaphenylendiamin ausgeführt, dass 10 Theile des Extractes, zu 100 ccm aufgefüllt, genau denselben Farbenton zeigten, wie 5 Theile einer Natriumnitritlösung von bekanntem N_2O_3-Gehalt, ebenfalls zu 100 ccm aufgefüllt. Also enthielt 1 ccm Extract ebensoviel Salpetrigsäure als $^1/_2$ ccm dieser Natriumnitritlösung.

1 ccm $NaNO_2$-Lösung enthielt $\frac{1}{100000}$ gr N_2O_3

$^1/_2$ „ „ „ „ $\frac{1}{200000}$ „ „

1 ccm Extract- „ „ $\frac{1}{200000}$ „ „

106 „ „ „ „ $\frac{1.106}{200000}$ „ „

$= 0{,}53$ mgr Salpetrigsäure.

Die Bestimmung der Salpetersäure nach der Methode von Marx-Trommsdorf ergab, dass 10 ccm einer Indigolösung, die so gestellt war, dass 10 ccm derselben 1 ccm der Salpeterlösung (1 ccm KNO_3 enthielt 2 mgr N_2O_5) entsprachen, verbraucht wurden, um 25 ccm Extract, die mit 50 ccm concentrirter Schwefelsäure versetzt waren, einen bläulich grünen Farbenton zu ertheilen.

10 ccm Indigolösung entsprechen 1 ccm KNO_3

d. h. 1 mgr N_2O_5

also auch 25 ccm Extract „ 1 mgr N_2O_5

106 „ „ „ $\frac{1.106}{25}$ „ „

„ 4,24 mgr Salpetersäure.

Zuletzt wurde das Extract eingedampft, bis zur Trockne gebracht und der Rückstand mit kalter concentrirter aus-

gekochter Salpetersäure betupft, worauf sich die Krystalle von Harnstoffnitrat zeigten. Obwohl sich nun ungefähr 1 gr Harnstoff im Rückstand nachweisen liess, so ist doch die gefundene Menge Salpetrigsäure und Salpetersäure, wenn auch im Vergleich mit den anderen Versuchen ziemlich beträchtlich, zu gering, um den Verbleib des Stickstoffs aus den nicht wiedergefundenen 2 gr Harnstoff zu erklären. Die Extracte wurden zwar hier, wie auch sonst stets, mit grösseren Mengen siedenden Wassers bereitet, es ist aber bei der Fähigkeit von Erde oder Kohle, gelöste Substanzen zurückzuhalten, durchaus nicht überraschend, dass bei dieser Extraction immer nur der kleinere Theil der beim Versuch verwendeten Substanzen — sofern solche nicht verändert waren — wiedergefunden wurde. Das Ergebniss, dass hier nur 1 gr wiedergefunden wurde, dürfte vielleicht in dem angedeuteten Sinne zu erklären sein.

V. Versuch.

Auch dieser Versuch wurde mit sterilisirten Substraten angestellt. Es wurde wieder Erde verwendet und dieselbe mit 200 ccm Harn, der auf 75 ccm eingedampft war, beschickt. Die Dauer dieses Versuches betrug ebenfalls acht Wochen. — Bei der Prüfung der Natronlaugevorlage zeigten sich in derselben ganz geringe Spuren von Salpetrigsäure, keine Salpetersäure. Die Schwefelsäurevorlage enthielt geringe Mengen von Ammoniak. Das Extract, das alkalisch reagirte und dessen Menge 63 ccm betrug, ergab 0,411 gr Ammoniak, weder Salpetrigsäure noch Salpetersäure, Spuren von Kohlensäure. Die kleine Menge Ammoniak, die bei diesem Versuche gefunden wurde, kann wohl daraus erklärt werden, dass der Harn nicht ganz frisch war und deshalb etwas Ammoniak enthielt. Nitrification war auch hier nicht eingetreten.

VI. Versuch.

Als Substrat wurde wieder Erde benutzt, welche mit 4 gr Pepton, in 100 ccm Wasser gelöst, beschickt und in

der üblichen Weise sterilisirt. Die Dauer des Versuches betrug auch hier wieder acht Wochen. — In der Natronlaugevorlage waren ganz geringe Mengen von Salpetrigsäure, keine Salpetersäure und Spuren von Kohlensäure nachzuweisen; in der Schwefelsäurevorlage ganz geringe Ammoniakreaction mit Nessler's Reagens. Das Extract, dessen Menge 112 ccm betrug und das ganz schwach alkalisch reagirte, enthielt 0,057 gr Ammoniak, weder Salpetrigsäure noch Salpetersäure. Im Rückstand konnte Pepton durch die Biuretreaction, die intensiv ausfiel, nachgewiesen werden. Es hatte also auch hier keine Nitrification stattgefunden.

VII. Versuch.

Gewöhnliche Gartenerde wurde sterilisirt und mit sterilisirten 4 gr Leucin, in 100 ccm Wasser aufgelöst, beschickt. Die Dauer des Versuches betrug acht Wochen. — In der Natronlaugevorlage wurden geringe Mengen von Salpetrigsäure, keine Salpetersäure und Spuren von Kohlensäure, in der Schwefelsäurevorlage etwas mehr Ammoniak als bei den Versuchen V und VI erkannt. Das Extract, das neutral reagirte und dessen Menge 109 ccm betrug, zeigte 0,315 gr Ammoniak, weder Salpetrigsäure noch Salpetersäure, etwas Kohlensäure. Im krystallinischen Rückstand des eingedampften Extractes wurden die charakteristischen Leucinkugeln in reichlicher Menge unter dem Mikroskop gefunden. Trotzdem ist aber die nachgewiesene Ammoniak-Menge so bedeutend, dass ein Zerfall von $^2/_3$ der angewendeten Leucinmengen stattgehabt haben musste. Was nun bei dem hieraus erschlossenen Zerfall aus dem Kohlenstoff-Wasserstoff-Sauerstoffcomplex geworden ist, geht aus der übrigen Analyse nicht hervor. Man hätte eigentlich bei diesem Ammoniakbefunde reichliche Kohlensäure finden müssen. Ob aus dem Leucin, das seiner Amidogruppe verlustig gegangen war, vielleicht eine Fettsäure und welche entstanden war, diese Frage zu entscheiden, war ich nicht in der Lage.

VIII. Versuch.

Verwendet wurde zu diesem Versuch Holzkohle, die sterilisirt und mit 4 gr Ammoniumcarbonat, in 100 ccm Wasser gelöst, beschickt wurde. Die Dauer des Versuches betrug auch hier acht Wochen.

Die Natronlaugevorlage ergab geringe Mengen von Salpetrigsäure, keine Salpetersäure und Spuren von Kohlensäure; in der Schwefelsäurevorlage konnte ich noch 0,068 gr Ammoniak nachweisen. Das Extract, das alkalisch reagirte und dessen Menge 152 ccm betrug, zeigte 0,144 gr Ammoniak, 2,58 mgr Salpetrigsäure und 22,49 mgr Salpetersäure. — Wenn man die Zersetzung des Ammoniumcarbonats, welche letzteres unter nitrificirenden Einflüssen erleiden kann, vom chemischen Standpunkte aus betrachtet und die Mengen von Ammoniak und Stickstoffoxyden berechnet, welche bei der vollständigen Ueberführung des Ammoniumcarbonats in dieselben entstehen können, so ergiebt sich, dass aus 4 gr Ammoniumcarbonat (als $(NH_4)_2\,CO_3 + 2\,(NH_4)\,H\,.\,CO_3$ angenommen), wenn dasselbe lediglich als Ammoniak wiedergefunden worden wäre, ungefähr 1 gr Ammoniak und bei vollständigem Uebergang in Stickstoffoxyde nahezu 3 gr N_2O_4 (mittlerer Werth zwischen N_2O_3 und N_2O_5) hätten entstehen können. Der Vergleich zwischen diesen theoretisch berechneten Zahlen mit den beim Versuch wirklich gefundenen zwingt uns zu der Annahme, dass das Ammoniumcarbonat im reichsten Maasse in der Kohle geblieben ist. Nehmen wir nun an — und es ist kein Gegengrund vorhanden —, dass die verwendeten Substrate und Salze wirklich steril gewesen sind, so würde sich in jedem Falle der Schluss ergeben, dass unter den beim Versuch inne gehaltenen Bedingungen trotz des Ausschlusses der Mikroorganismen eine Nitrification zu Stande gekommen ist.

IX. Versuch.

Ein Gemisch von Gartenerde und Sand wurde mit 200 ccm Harn, die auf 75 ccm eingedampft waren, beschickt

und das Ganze unsterilisirt gelassen. Die Dauer dieses Versuches betrug acht Wochen. — Die Prüfung der Natronlaugevorlage ergab ganz geringe Mengen von Salpetrigsäure, keine Salpetersäure, aber viel Kohlensäure. In der Schwefelsäurevorlage erkannte ich 0,498 gr Ammoniak. Das Extract, das alkalisch reagirte und dessen Menge 105 ccm betrug, zeigte 0,0999 gr Ammoniak, und die durch Indigotitration gefundene Salpetrigsäure und Salpetersäure betrug 4,97 mgr. In dem eingedampften und bis zur Trockne gebrachten Rückstand konnten Krystalle von Harnstoffnitrat nicht nachgewiesen werden.

X. Versuch.

Diesmal wurde Holzkohle mit 4 gr Pepton (in 100 ccm Wasser aufgelöst) beschickt und weder das Substrat noch das Salz sterilisirt. Die Dauer des Versuches betrug acht Wochen. — Nach Verlauf dieser Zeit zeigte die Natronlaugevorlage Spuren von Salpetrigsäure, keine Salpetersäure; die Schwefelsäurevorlage 0,272 gr Ammoniak. Das Extract, das neutral reagirte und 97 ccm betrug, enthielt 0,186 gr Ammoniak, 0,129 mgr Salpetrigsäure, 6,208 mgr Salpetersäure und reichlich Kohlensäure. Pepton konnte im Extract durch die Biuretreaction nicht nachgewiesen werden.

XI. Versuch.

Bei diesem Versuche wurde die Gartenerde mit 3½ gr Leucin (in 100 ccm Wasser gelöst) wie gewöhnlich beschickt und unsterilisirt gelassen. Es wurde dieser Versuch mit den fünf folgenden zu gleicher Zeit und zwar am 10. Mai angestellt und ebenfalls zu gleicher Zeit, am 25. Juni, abgebrochen. Die Dauer betrug also 46 Tage. — Bei dem vorstehenden Versuch konnte ich in der Natronlaugevorlage nur geringe Spuren von Salpetrigsäure und keine Salpetersäure nachweisen. Die Schwefelsäurevorlage zeigte 0,261 gr Ammoniak. Das Extract, das neutral reagirte und dessen Menge 162 ccm betrug, enthielt 0,239 gr Ammoniak, Spuren

von Salpetrigsäure, 1,666 mgr Salpetersäure. Nitrification war also eingetreten. Obwohl bei den meisten Versuchen wohl bestimmbare Salpetersäuremengen gefunden wurden, so scheint doch, nachdem ich die Beobachtung gemacht habe, dass die Indigotitration bei solchen Analysen, wie sie hier vorliegen, von sehr zweifelhaftem Werthe ist, die Annahme nicht unberechtigt, dass die gefundenen Salpetersäuremengen etwas hinter dem wahren Werth an vorhandener Salpetersäure zurückbleiben, und es wird daher späteren Versuchen übrig bleiben, diese Resultate unter Anwendung einer sicheren quantitativen Prüfung auf Salpetersäure zu controliren.

XII. Versuch.

Nicht sterilisirte Holzkohle wurde mit 3 gr Ammoniumcarbonat, das in 100 ccm Wasser gelöst war, beschickt. Die Dauer des Versuches betrug wieder 46 Tage. — Bei der Untersuchung ergab die Natronlauge-Vorlage Salpetrigsäure nicht sicher, keine Salpetersäure; die Schwefelsäurevorlage 0,118 gr Ammoniak. Das Extract, das neutral reagirte und dessen Menge 210 ccm betrug, zeigte 0,146 gr Ammoniak, etwas Salpetrigsäure, 126 mgr Salpetersäure. Auch hier hatte also Nitrification stattgefunden.

XIII. Versuch.

3 gr sterilisirtes, in 100 ccm Wasser gelöstes Ammoniumcarbonat wurde auf ebenfalls sterile Erde gegeben und der Versuch 46 Tage lang fortgesetzt. — Als Resultat ergab sich in der Natronlaugevorlage weder Salpetrigsäure noch Salpetersäure. Die Schwefelsäurevorlage zeigte 0,331 gr Ammoniak. Das Extract, das neutral reagirte und dessen Menge 160 ccm betrug, enthielt 0,236 gr Ammoniak, Spuren von Salpetrigsäure und 0,44 mgr Salpetersäure. Die Kohlensäureentwicklung nach Zusatz von Salzsäure war nicht sehr bedeutend. — Bei diesem Versuche war offenbar ein Theil des Ammoniumcarbonats durch den Ventilationsstrom in die Schwefel-

säurevorlage hinübergerissen, ein anderer Theil aber in dem Substrat in Kohlensäure und Ammoniak gespalten und letzteres von der Erde, welche bekanntlich für Ammoniak ein grosses Absorptionsvermögen zeigt, zurückgehalten worden.

XIV. Versuch.

Diesmal wurde wieder Erde verwendet und dieselbe mit 4 gr Harnstoff, in 100 ccm Wasser gelöst, beschickt, das Ganze unsterilisirt gelassen. Die Dauer des Versuches betrug 46 Tage. — Das Ergebniss war folgendes: In der Natronlaugevorlage waren Spuren von Salpetrigsäure, keine Salpetersäure und viel Kohlensäure nachzuweisen; die Schwefelsäurevorlage reagirte alkalisch und zeigte starken Ammoniakgeruch, es konnte über 1 gr Ammoniak darin nachgewiesen werden. Wegen der alkalischen Reaction untersuchte ich die Schwefelsäurevorlage auf Salpetrigsäure und Salpetersäure, ohne diese Substanzen nachweisen zu können. Das Extract, welches neutral reagirte und dessen Menge 150 ccm betrug, enthielt 0,104 gr Ammoniak, etwas Salpetrigsäure, 0,36 mgr Salpetersäure und grosse Mengen Kohlensäure. Es ist bei diesem Versuche anzunehmen, dass der Harnstoff, der ja auch an der Luft ausserordentlich schnell zerfällt, fast ganz zersetzt worden ist.

XV. Versuch.

Zu diesem Versuche verwendete ich Erde, beschickte sie mit dem Eiweiss von zwei Hühnereiern und sterilisirte nicht. Die Dauer des Versuches betrug wieder 46 Tage. — Als Ergebniss zeigten sich in der Natronlaugevorlage Spuren von Salpetrigsäure, keine Salpetersäure, aber nicht unerhebliche Kohlensäure-Mengen. Die Schwefelsäurevorlage ergab 0,229 gr Ammoniak und keinen Schwefelwasserstoff. Das Extract, das neutral reagirte und 140 ccm betrug, enthielt 0,15 gr Ammoniak, die durch Indigotitration gefundene Salpetrig-

säure und Salpetersäure betrug 0,28 mgr. Kohlensäure war in reichlicher Menge vorhanden. Die Prüfung auf Eiweiss mit Ferrocyankalium und Essigsäure fiel negativ aus.

XVI. Versuch.

Der letzte Versuch wurde ebenfalls mit dem Eiweiss von zwei Hühnereiern angestellt; dasselbe wurde aber diesmal sterilisirt und auch auf sterilisirte Kohle gegeben. Das Ergebniss war folgendes: In der Natronlaugevorlage konnte ich weder Salpetrigsäure, noch Salpetersäure, noch Schwefelwasserstoff, noch eine bedeutende Kohlensäuremenge nachweisen. Die Schwefelsäurevorlage enthielt 0,093 gr Ammoniak. Das Extract, das neutral reagirte und dessen Menge 105 ccm betrug, zeigte kein Ammoniak, keine Salpetrigsäure und 2,62 mgr Salpetersäure. Die Eiweissprüfung mit Ferrocyankalium und Essigsäure fiel positiv aus.

Auf Grund der nachstehenden Tabelle, welche ich aus der allgemeinen Uebersicht meiner Resultate herausgehoben habe, lässt sich eine entscheidende Antwort auf die Frage nach der Bedeutung der Mikroorganismen für die Nitrification nicht ableiten. Denn von 9 unter Sterilisirung angestellten Versuchen fand ich immerhin bei 4 wohlnachweisbare Mengen von Stickstoffoxyden. — Geht man an die ganze Frage mit einer gewissen Voreingenommenheit heran, so käme man hierbei über das Resultat sehr leicht hinweg mit der Annahme, dass die Sterilisirung bei diesen Versuchen eine ungenügende gewesen sei. Ich habe indess weder in meinem Verfahren, noch während des Ganges meiner Versuche irgend welche Momente finden können, welche jene Annahme rechtfertigten. Wenngleich nun diese Ergebnisse meiner Versuche wenig mit der Theorie von der Bedeutung der nitrificirenden Bacterien übereinstimmen, so zeigt sich andererseits doch in der Mehrzahl meiner Versuche, dass Sterilisirung die Nitrification hintanhält, während in jedem Falle auf nicht

Versuche mit sterilisirtem Substrat.

	I. Gruppe 8. Februar bis 1. März		II. Gruppe 7. März bis 5. Mai					III. Gruppe 10. Mai bis 25. Juni	
	Versuch II. 3 gr Salmiak; Substr.: Erde	Versuch III. 3 gr. Harnstoff; Subst.: Kohle	Versuch IV. 4 gr. Harnstoff; Substr.: Erde	Versuch V. 200 ccm Harn; Substr.: Erde	Versuch VI. 4 gr Pepton; Substr.: Erde	Versuch VII. 2 gr Leucin; Substr.: Erde	Versuch VIII. 4 gr Ammoniumcarbonat; Subst: Kohle	Versuch XIII. 3 gr Ammoniumcarbonat; Substr.: Erde	Versuch XVI. Eiweiss von 2 Hühnereiern; Substr.: Erde
1) Natronlauge a. $N_2 O_3$	nichts	Spuren	nicht sicher	nicht sicher	nicht sicher	nicht sicher	nicht sicher	nichts	nichts
b. $N_2 O_5$	nichts	nichts	nichts	nichts	nichts	nichts	nichts	nichts	nichts
2) Schwefelsäure NH_3	ziemlich stark	nichts	nicht erheblich	nicht erheblich	nicht erheblich	ziemlich beträchtl.	0,068 gr.	0,331 gr.	0,093 gr.
3) Extract der Substrate a. Reaction	neutral	neutral	schwach alkalisch	alkalisch	ziemlich schwach alkalisch	neutral	alkalisch	neutral	neutral
b. NH_3	reichlich	reichlich	0,1 gr.	0,411 gr.	0,057 gr.	0,315 gr.	0,144 gr.	0,236 gr.	nichts
c. $N_2 O_3$	nichts	nichts	0,53 mgr.	nichts	nichts	nichts	2,58 mgr.	Spuren	nichts
d. $N_2 O_5$	nichts	nichts	4,24 mgr.	nichts	nichts	nichts	22,44 mgr.	0,448 mgr.	2,62 mgr.
e. Rückstand			Harnstoffkrystalle		Pepton	Leucinkugeln			Eiweiss

Versuche mit nicht sterilisirtem Substrat.

I. Gruppe 8. Februar bis 1. März		II. Gruppe 7. März bis 5. Mai		III. Gruppe 10. Mai bis 25. Juni			
	Versuch I. 3 gr Ammoniumcarbonat; Substr.: Erde	Versuch IX. 200 ccm Harn; Substr.: Erde	Versuch X. 4 gr Pepton; Substr.: Kohle	Versuch XI. 3½ gr Leucin; Subst.: Erde	Versuch XII. 3 gr Ammoniumcarbonat; Substr.: Kohle	Versuch XIV. 3½ gr Harnstoff; Substr.: Erde	Versuch XV. Eiweiss von 2 Hühnereiern; Subst.: Erde
1) Natronlauge a. N_2O_3	Spuren	nicht sicher	nicht sicher	nicht sicher	nicht sicher	Spuren	Spuren
b. N_2O_5	nichts	nichts	nichts	nichts	nichts	nichts	nichts
2) Schwefelsäure NH_3	reichlich	0,498 gr.	0,272 gr.	0,261 gr.	0,118 gr.	1,0 gr.	0,229 gr.
3) Extract des Substrates a. Reaction	schwach alkalisch	alkalisch	neutral	neutral	neutral	neutral	neutral
b. NH_3	reichlich	0,0999 gr.	0,186 gr.	0,239 gr.	0,146 gr.	0,104 gr.	0,15 gr.
c. N_2O_3	nichts	$N_2O_3 + N_2O_5 = 4{,}97$ mgr.	0,121 mgr.	Spuren	Spuren	etwas	$N_2O_3 + N_2O_5 = 0.29$ mgr.
d. N_2O_5	beträchlich		6,208 mgr.	1,666 mgr.	1,26 mgr.	0,36 mgr.	
e. Rückstand			kein Pepton	kein Leucin		kein Harnstoff	kein Eiweiss

Salpetrigsäure- und Salpetersäurebildung.

Versuche mit sterilisirtem Substrat.

	I. Gruppe 8. Februar bis 1. März		II. Gruppe. 7. März bis 5. Mai					III. Gruppe 10. Mai bis 25. Juni	
	Versuch II. 3 gr Salmiak; Substr.: Erde	Versuch III. 3 gr. Harnstoff; Subst.: Kohle	Versuch IV. 4 gr. Harnstoff; Substr.: Erde	Versuch V. 200 ccm Harn; Substr.: Erde	Versuch VI. 4 gr Pepton Substr.: Erde	Versuch VII. 4 gr Leucin Substr.: Erde	Versuch VIII. 4 gr Ammoniumcarbonat; Substr.: Erde	Versuch XIII. 3 gr Ammoniumcarbonat; Substr.: Erde	Versuch XVI. Eiweiss von 2 Hühnereiern; Substr.: Erde
Extract a. N_2O_3	nichts	nichts	0,53 mgr.	nichts	nichts	nichts	2,58 mgr.	Spuren	nichts
b. N_2O_5	nichts	nichts	4,24 mgr.	nichts	nichts	nichts	22,44 mgr.	0,448 mgr.	2,62 mgr.

Versuche mit nicht sterilisirtem Substrat.

	I. Gruppe. 8. Februar bis 1. März	II. Gruppe 7. März bis 5. Mai		III. Gruppe 10. Mai bis 25. Juni			
	Versuch I. 3 gr Ammoniumcarbonat; Substr.: Erde	Versuch IX. 200 ccm Harn; Substr.: Erde	Versuch X. 4 gr Pepton; Substr.: Kohle	Versuch XI. 3½ gr Leucin; Subst.: Erde	Versuch XII. 3 gr Ammoniumcarbonat; Substr.: Kohle	Versuch XIV. 3½ gr Harnstoff; Substr.: Erde	Versuch XV. Eiweiss von 2 Hühnereiern; Subs.: Kohle
Extract a. N_2O_3	nichts	$N_2O_3 + N_2O_5$ = 4,79 mgr.	0,129 mgr.	Spuren	Spuren	etwas	$N_2O_3 + N_2O_5$ = 0,28 mgr.
b. N_2O_5	beträchtlich		6,208 mgr.	1,66 mgr.	1,26 mgr.	0,36 mgr.	

sterilisirten Substraten eine mehr oder minder starke Nitrification statt hatte.

Es stehen sich ja auch die Meinungen der Forscher auf diesem Gebiete noch sehr scharf gegenüber, und ich würde mich, selbst wenn ich auch über mehr Versuchsmaterial zu verfügen hätte, nicht in der Lage glauben, auf Grund von, wenn auch noch so sorgfältig angestellten Versuchen, die in einem halben Jahre gemacht werden können, hierin ein entscheidendes Urtheil abzugeben. Für jetzt muss ich mir genügen lassen, zu dieser so ausserordentlich interessanten und geradezu brennenden Frage mit meinen Versuchen einen kleinen Beitrag geliefert zu haben.

Soviel, glaube ich, wird man auf Grund der unter den beschriebenen Verhältnissen angestellten Versuche schliessen dürfen (was sich anschliesst an die von Schlösing und Müntz, Werrington, Plath u. s. w. gefundenen Resultate), dass die Gegenwart von Mikroorganismen die Bildung von Stickstoffoxyden aus stickstoffhaltigen organischen Substanzen wesentlich begünstigt, im Gegensatz zu den Ergebnissen, die Frank erhalten hatte, dass nämlich die Mikroorganismen mit der Nitrification nichts zu thun hätten.

Zum Schlusse erfülle ich noch die angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Rosenthal für die Ueberweisung des Themas, sowie Herrn Dr. Schultz, Assistenten am physiologischen Institute für die Prüfung meiner Befunde und für die mir bei der Untersuchung freundlichst ertheilten Rathschläge meinen besten Dank auszusprechen.

Druck von Louis Borchardt in Berlin SW.